

## 継代培養がウェルシュ菌の孢子形成能力に及ぼす影響

赤 枝 宏 ・ 谷 口 忠 敬

Influence of Subculture on the Spore Forming Ability of  
*Clostridium perfringens*

Hiroshi AKAEDA and Tadataka TANIGUTI

The influence of the repetitions of 12-hour incubation or 24-hour incubation in three different media on the reduction of the spore forming ability of *Clostridium perfringens* in the sporulation medium (DS medium) has been studied.

1) The increasing the number of the repetitions of the 12-hour incubation in the thioglycollate medium with 2% glucose decreased the spore forming ability of tested strains (NCTC 8238, 8239, 8798) in the sporulation medium.

2) In the case of NCTC 8238, the increasing the number of the repetitions of 12-hour incubation in the cooked meat medium decreased the spore forming ability in the sporulation medium, but the repetitions of 24-hour incubation in the cooked meat medium only slightly decreased the spore forming ability.

On the other hand, the repetitions of 12-hour incubation in the cooked meat medium with 2% gall powder as a subculture medium only slightly decreased the spore forming ability of NCTC 8238, and the repetitions of 24-hour incubation in the medium did not almost decreased the spore forming ability.

3) When the subculture media were heated (75°C, 20 min) immediately following the inoculation, the second incubation of 12-hour incubation in the cooked meat medium as a subculture medium remarkably decreased the spore forming ability of NCTC 8238, but the increasing the number of the repetitions of 24-hour incubation in the medium increased the spore forming ability of NCTC 8238.

On the other hand, the culture in 12-hour incubation in the cooked meat medium with 2% gall powder as a subculture medium was killed by the heating, but the repetitions of 24-hour incubation in the medium did not almost decreased the spore forming ability of NCTC 8238.

## 緒 言

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は孢子形成性のグラム陽性の嫌気性細菌であり、一般には孢子を形成しにくい (1) とされている。本菌による食中毒は一般にA型に属し耐熱性孢子を形成する菌株による場合が多く (2, 3), エンテロトキシン産生性の本菌菌株が消化管内で増殖し、孢子を形成する際に孢子嚢中にエンテロトキシンを産生し、孢子嚢中から消化管内にエンテロトキシンが溶出して

起こるとされている (4, 5)。本菌食中毒患者の糞便からは、耐熱性孢子が数多く検出される場合が多く (3), 一方、一般に食中毒由来分離株は培養保存中に耐熱性が低下するといわれる。これらの事柄は本菌の孢子形成能力が本菌の培養条件によって容易に低下することを示唆するものと思われる。従って、この様な本菌の孢子形成能力の低下に影響する諸因子を明らかにすることは食品衛生上から重要と考えられる。

この様な見地から、本研究においては、継代培養

時間および継代培養培地の種類が本菌の孢子形成能力の低下に及ぼす影響を、グルコース添加チオグリコレート培地およびクックドミート培地を用いて試験した。また、十二指腸に分泌される胆汁は本菌の孢子形成を抑制する(6)と言われるので、胆汁末添加クックドミート培地を用いても同様に試験した。

## 実験方法

### 1. 供試株

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) NCTC 8238, 8239 および 8798 を供試した。供試株はクックドミート培地で37℃, 3日間培養後, -30℃に凍結保存し, これを実験に供した。

### 2. 継代培養

継代培養としては, 次の3種類の培地を供試した。すなわち, 1) グルコース2%添加チオグリコレート培地(2%GTGC培地と略記): チオグリコレート培地(BBL製品)にグルコース(和光純薬製品)を最終濃度として2%になるよう添加したもの, 2) クックドミート培地(CM培地と略記: DIFCO製品), および, 3) 胆汁末2%添加CM培地(2%GPCMと略記): 牛胆汁末(和光純薬製品)を最終濃度として2%になるように添加したCM培地の3種類の培地を, それぞれバイアルに10ml宛分注し, 120℃で20分間滅菌したものを継代培地として供試した。

### 3. 継代培養法

1) 接種菌の孢子形成能力およびその調整法: 孢子形成培地における孢子形成能力(孢子形成率)が60%以上を示すCM培地12時間培養菌を初代継代培養用の接種菌として使用した(但し, 継代培地としてCM培地を用い, 継代培地接種直後に加熱処理を加え, 24時間培養単位で継代培養する場合の初代継代培養用接種菌の孢子形成能力は34%とした)。初代継代培養用の接種菌は次の方法で調整した。すなわち, 供試株を凍結保存培養(実験方法1)から再分離し, CM培地(10ml)に接種し, 37℃で2日間培養した。このCM培養菌の孢子形成能力が低い時にはCM培養菌液(0.1ml)をCM培地に接種後, 加熱処理(75℃, 20min)を加え, 37℃で2日間培養する操作を繰り返す方法によって孢子形成能力が60%以上になるように調整した。

2) 継代培養法: 継代培地として2%GTGC培地を用いた場合には, NCTC 8238, 8239 および 8798の3株の初代継代培養用の接種菌液(0.1ml)を2%GTGC培地(10ml)に接種し, 37℃で12時間培養し, 次に, この12時間培養菌液(0.1ml)を2%GTGC培地に接種し, 37℃で12時間培養する操作を繰り返した。

一方, 継代培地としてCM培地および2%GPCM培地を用いた場合には, NCTC 8238の初代継代培養用の接種菌液(0.1ml)を各継代培地(10ml)に接種し, 各継代培地毎に継代培養時間を12時間と24時間の2組に分けて37℃で培養し, 次に, 各継代培養菌液(0.1ml)を各継代培地に接種し, 37℃で各継代培養時間の培養を行う操作を繰り返した。なお, 比較の為に各継代培養を繰り返す度に各継代培地に接種した直後に加熱処理(75℃, 20min)を加えてから継代培養する場合も行った。

### 4. 孢子形成能力(孢子形成培養における孢子形成率)の測定法

被検培養菌液(0.1ml)を孢子形成培地(100ml)に接種し, 37℃で9時間培養した。孢子形成培養菌液2mlを等量の生理食塩水に懸濁させて遠心分離(3000rpm, 10min)し, 沈殿した菌体を10%中性ホルマリン4mlに懸濁させて固定した。このホルマリン固定液について, 位相差顕微鏡で50細胞以上を検鏡し, 孢子形成のstage III (fore spore)以上を孢子形成細胞とみなし, 孢子形成率(SRと略記)を測定した。この孢子形成培養におけるSRを被検培養菌液の孢子形成能力とした。なお, 孢子形成培地としてはチオグリコール酸ナトリウムのかわりにL-アスコルビン酸ナトリウムを0.5%(7)加えたDS培地(8)を使用し, 孢子形成培養には培養びんを使用した。

## 実験結果

### 1. 継代培地として2%GTGC培地を用いた12時間培養の反復がウェルシュ菌の孢子形成能力に及ぼす影響

供試株 NCTC 8238, 8239 および 8798 について, 孢子を形成し得ない培地条件での継代培養および継代培養回数が孢子形成能力に及ぼす影響を見る為に, 継代培地として2%GTGC培地を用い, 12時間培養単位での2, 4, 8回の継代培養が供試株の

孢子形成能力に及ぼす影響を比較試験した。結果を Fig. 1 に示した。

継代培地として 2%GTGC培地を用いた12時間培養単位での継代培養菌の孢子形成能力(孢子形成培養におけるSR値)は、NCTC 8238, 8239 および 8798 の3株とも、継代培養回数が多い時ほど低かった。すなわち、いずれの菌株も孢子形成培養におけるSR値は2%GTGC培地による継代培養の回数の増加と共にほぼ直線的に低下し、継代培養開始直前の孢子形成能力が60%と比較的に低かった NCTC 8239 においては、継代培養4回でSR値は1%未満となり、継代培養開始直前の孢子形成能力が74%, 92%であった NCTC 8798, 8238 においても、継代培養6回, 8回でSR値はそれぞれ1%未満になった。

## 2. 継代培地接種直後に加熱処理を加えずに、継代培地としてCM培地および2%GPCM培地を用いた時の、12時間、或いは24時間培養の反復がウェルシュ菌の孢子形成能力に及ぼす影響

供試株 NCTC 8238 について、継代培地としてCM培地および2%GPCM培地を用いた、継代培地

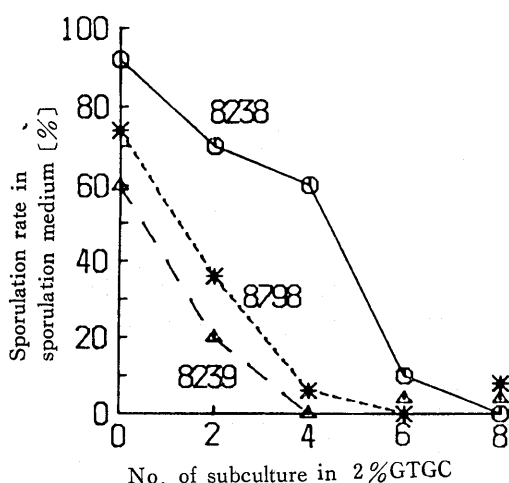


Fig. 1. Influence of the number of subculture in thioglycollate medium with 2% glucose on the spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8238, 8239 and 8798 in sporulation medium.  
Subculture: incubation time ..... repetition of 12-hour incubation; incubation temperature ..... 37°C.  
Sporulation culture: incubated at 37°C for 9 hours.  
2% GTGC: thioglycollate medium with 2% glucose.

接種直後の加熱処理なしの、12時間培養単位、或いは24時間培養単位での2, 4, 8回の継代培養が供試株の孢子形成能力に及ぼす影響を比較試験した。結果を Fig. 2 に示した。

1) CM培地の場合: 継代培地としてCM培地を用いた12時間培養単位での継代培養菌の孢子形成能力(孢子形成培養におけるSR値)は、継代培養回数が多い時ほど低かった。すなわち、継代培養回数の増加と共に孢子形成培養におけるSR値はほぼ直線的に低下し、継代培養開始直前のSR値が90%であったのに対し継代培養8回のSR値は6%の低値であった。

一方、継代培地としてCM培地を用いた24時間培養単位の継代培養菌の孢子形成能力は、継代培養回数が増加しても僅かに低下したに過ぎなかった。すなわち、継代培養開始直前のSR値が90%であったのに対し継代培養8回におけるSR値も65%と比較的に高い値を示した。

2) 2%GPCM培地の場合: 継代培地として2%GPCM培地を用いた12時間培養単位での継代培養菌の孢子形成能力は、継代培養回数が増加しても僅かに低下したに過ぎなかった。すなわち、継代培養開始直前のSR値が90%であったのに対し継代培養8回におけるSR値も76%と比較的に高い値を示した。

一方、継代培地として2%GPCM培地を用いた24時間培養単位での継代培養菌の孢子形成能力は、継代培養回数が増加してもほとんど低下しなかった。すなわち、継代培養開始直前のSR値が90%であったのに対し継代培養2, 4, 6, 8回におけるSR値はそれぞれ92, 88, 90, 86%であった。

## 3. 継代培地接種直後に加熱処理を加え、継代培地としてCM培地および2%GPCM培地を用いた時の、12時間、或いは24時間培養の反復がウェルシュ菌の孢子形成能力に及ぼす影響

供試株 NCTC 8238 について、継代培地としてCM培地および2%GPCM培地を用い、継代培地接種直後に加熱処理(75°C, 20min)を加えた、12時間培養単位、或いは24時間培養単位での2, 4, 8回の継代培養が供試株の孢子形成能力に及ぼす影響を比較試験した。結果を Fig. 3 に示した。

1) CM培地の場合: 継代培地としてCM培地を用い、継代培地接種直後に加熱処理した時の、12時間培養単位での継代培養菌の孢子形成能力(孢子形

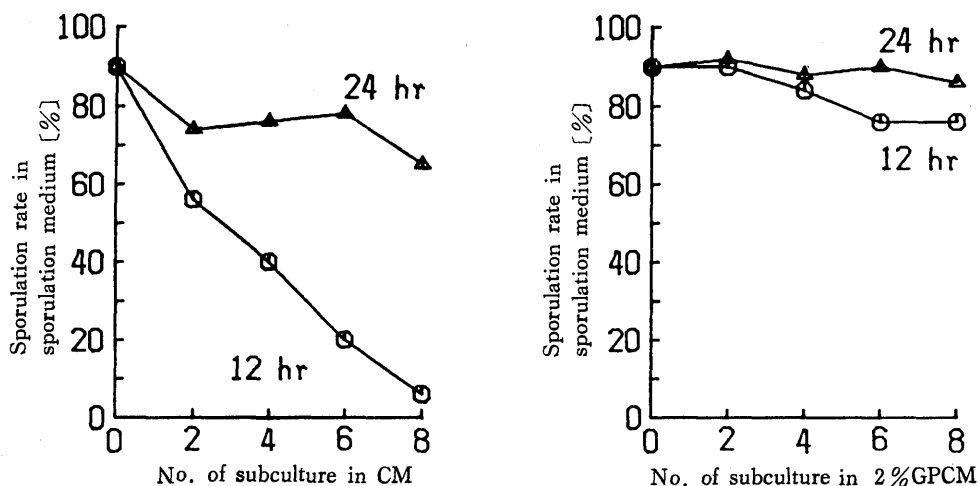


Fig. 2. Influence of the incubation time for subculture and of the number of subculture when the culture media were not heated immediately following inoculation [that is, immediately preceding incubation] on the spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8238 in sporulation medium.

Subculture [12 hr] : incubation time ..... repetition of 12-hour incubation; incubation temperature ..... 37°C.

Subculture [24 hr] : incubation time ..... repetition of 24-hour incubation; incubation temperature ..... 37°C.

Sporulation culture : see Fig. 1.

CM : cooked meat medium.

2% GPCM : cooked meat medium with 2% gall powder.

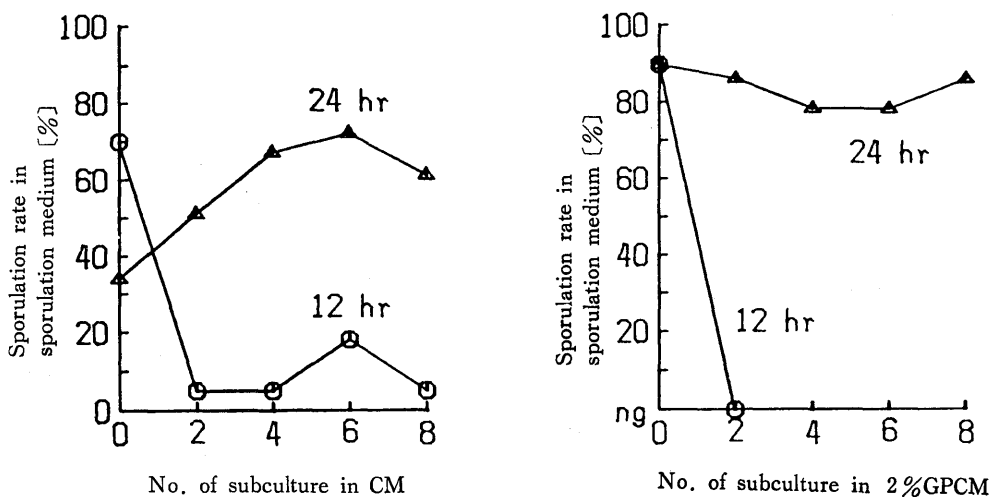


Fig. 3. Influence of the incubation time for subculture and of the number of subculture when the culture media were heated [75°C, 20 min] immediately following inoculation [that is, immediately preceding incubation] on the spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8238 in sporulation medium.

Subculture [12 hr] : incubation time ..... repetition of 12-hour incubation; incubation temperature ..... 37°C.

Subculture [24 hr] : incubation time ..... repetition of 24-hour incubation; incubation temperature ..... 37°C.

Sporulation culture : see Fig. 1.

ng : negative and not grown in 2% GPCM.

CM : cooked meat medium.

2% GPCM : cooked meat medium with 2% gall powder.

成培養におけるSR値)は、2回の継代培養で著しく低下した。すなわち、継代培養開始直前の孢子形成培養におけるSR値が70%であったのに対し継代培養2, 4, 6, 8回におけるSR値はそれぞれ5, 5, 18, 5%であった。このことは、前述の継代培地接種直後の加熱処理なしの時に継代培養回数の増加につれてSR値が段階的に低下したのとは異なった。

一方、継代培地としてCM培地を用い、継代培地接種直後に加熱処理した時の、24時間培養単位での継代培養菌の孢子形成能力は、継代培養回数の増加と共に上昇した。すなわち、継代培養開始直前のSR値が34%であったのに対し継代培養2, 4, 6, 8回におけるSR値はそれぞれ51, 67, 72, 61%であった。このことは、前述の継代培地接種直後に加熱処理しない時のCM培地24時間培養単位でのSR値が継代培養回数が増加しても僅かに低下したに過ぎなかったこと、および、前述の継代培地接種直後に加熱処理した時のCM培地12時間培養単位でのSR値が継代培養2回で著しく低下したことは異なった。

2) 2%GPCM培地の場合： 継代培地として2%GPCM培地を用い、継代培地接種直後に加熱処理した時の、12時間培養単位での継代培養菌の孢子形成能力は、継代培養2回目において本供試株の発育がみられず陰性となった。このことは、前述の2%GPCM培地12時間培養単位での継代培地接種直後の加熱処理なしの時にSR値が継代培養回数が増加しても僅かに低下したに過ぎなかったことは異なった。

一方、継代培地として2%GPCM培地を用い、継代培地接種直後に加熱処理した時の、24時間培養単位での継代培養菌の孢子形成能力は、継代培養回数が増加しても殆ど低下しなかった。すなわち、継代培養開始直前のSR値が90%であったのに対し継代培養2, 4, 6, 8回におけるSR値はそれぞれ86, 78, 78, 86%であった。このことは、前述の継代培地接種直後の加熱処理なしで継代培地として2%GPCM培地を用いて12および24時間培養単位で継代培養した場合とほぼ同様であり、また、前述の継代培地として2%GPCM培地を用い、継代培地接種直後に加熱処理した時の、12時間培養単位での継代培養が、継代培養2回目に死滅したことは異なった。

## 考 察

供試株NCTC 8238を、継代培地としてCM培地を用いて継代培地接種直後に加熱処理(75℃, 20 min)してから、継代培養した場合、12時間培養単位で反復培養すると2回の継代培養で孢子形成能力が著しく低下し、一方、24時間培養単位で反復培養すると継代培養回数の増加と共に孢子形成能力が上昇したが、これらの結果から次のことが考えられる。すなわち、CM培地12時間培養単位での反復培養においては成熟孢子は殆ど形成されておらず、形成された孢子的の大部分が未成熟段階にあり、この未成熟孢子が加熱処理によって孢子形成能力を損傷された状態で生残し、発芽・発育した結果、培養細胞の孢子形成能力が継代培養によって著しく低下したものと考えられる。一方、24時間培養単位での反復培養においては十分な耐熱性を有する成熟孢子が多量に形成されており、加熱処理によって孢子形成能力を損傷されていない成熟孢子が多量に選択的に生残し、発芽・発育した結果、培養細胞の孢子形成能力が継代培養回数の増加と共に上昇したものと考えられる。

NCTC 8238を、継代培地としてCM培地を用いて(継代培地接種直後の加熱処理なしで)、24時間培養単位で反復培養すると孢子形成能力は継代培養回数が増加しても大きくは低下せず、12時間培養単位で反復培養すると孢子形成能力が継代培養回数の増加と共に明確に低下した。他方、NCTC 8238, 8239, 8798を、継代培地として2%GTGC培地を用いて、12時間培養単位で継代培養すると供試3株の孢子形成能力は継代培養回数の増加によって明確に低下した。このことは、加熱処理しない時でも高い孢子形成能力を継代する為には、継代培養菌液中に成熟孢子が多量に存在していることが有利であることを示唆するものであろう。なお、この結果から成熟孢子が形成されていない状態で反復培養すると孢子形成能力が急速に低下することは明らかであるが、継代培養時において細胞の所有する孢子形成能力を低下させる所の直接・間接の諸因子の解明は今後の問題である。

NCTC 8238を、継代培地として2%GPCM培地を用いて、継代培地接種直後の加熱処理なしで、12時間培養単位および24時間培養単位で反復培養すると継代培養回数が増加しても孢子形成能力は、殆ど或いは全く低下しなかった。これらの結果から次の

ことが考えられる。すなわち、胆汁の主成分である胆汁酸 (10, 11) は本菌の孢子形成を抑制する (6) といわれ、2%GPCM12時間培養においても供試株の孢子の形成は認められず、これを加熱処理すると死滅したことから、胆汁末が直接的に或いは間接的に供試株の栄養細胞に作用して細胞の孢子形成能力の低下を防止することは明らかである。また、胆汁末による孢子形成能力の低下の防止に関する機構については今後の問題である。また、胆汁末が孢子形成能力の低い本菌の孢子形成能力を上昇させるか否かについても興味を持たれる。

### 要 約

継代培地による反復培養がウェルシュ菌の孢子形成培地における孢子形成能力の低下に及ぼす影響を、12時間の継代培養を繰り返した場合と24時間の継代培養を繰り返した場合とについて比較・検討した。

1) 継代培地としてグルコース2%添加チオグリコレート培地を用いた12時間培養の反復によって、供試株 (NCTC 8238, 8239, 8798) の孢子形成能力が反復回数の増加とともに低下した。

2) 供試株 (NCTC 8238) の場合、継代培地としてクックドミート培地 (CM) を用いた時には、孢子形成能力は12時間の継代培養を反復すると反復回数の増加によって低下し、24時間の培養を反復すると反復回数が増加しても僅かに低下したに過ぎなかった。一方、継代培地として胆汁末2%添加クックドミート培地 (GPCM) を用いた時には、孢子形成能力は12時間の継代培養を反復すると反復回数が増加しても僅かに低下したに過ぎず、24時間の培養を反復すると殆ど低下しなかった。

3) 継代培地接種直後に加熱処理 (75℃, 20 min) した場合には、継代培地としてCMを用いた時には、供試株 (NCTC 8238) の孢子形成能力は2

回の12時間培養によって著しく低下し、24時間培養の反復においては反復回数の増加と共に上昇した。一方、継代培地としてGPCMを用いた時には、12時間培養菌は加熱処理によって死滅した。24時間培養の反復においては、反復によって孢子形成能力は殆ど低下しなかった。

### 文 献

- 1) Society of American Bacteriologists (1957). *Manual of Microbiological Method*, McGraw-Hill Book Co. INC., New York, 131.
- 2) 善養寺 浩 (1965). 食衛誌, 6, 133-143.
- 3) Hobbs, B. C., Smith, M. E., Oakley, C. L., Warrack, G. H., and Cruickshank, J. C. (1953). *J. Hyg.*, 51, 75-101.
- 4) Hauschild. A. H. W., Niilo, L., and Dorward, W. J. (1971). *Appl. Microbiol.*, 17, 987-991.
- 5) Hauschild. A. H. W. (1973). *Canadian Institute Food Science and Technology Journal.*, 6, 106-110.
- 6) Hickey, C. S., and Johnson, M. G. (1981). *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 124-129.
- 7) 谷口忠敬・橘 勝康 (1980). 長崎大学水産学部研究報告, No. 48, 35-39.
- 8) Duncan, C. L., and Strong. D. H. (1968). *Appl. Microbiol.*, 16, 82-89.
- 9) 谷口忠敬・中村 寧 (1981). 長崎大学水産学部研究報告, No. 50, 27-31.
- 10) 医学大辞典 (1971). 南山堂, 東京, 981.
- 11) 牧野 勲・中川昌一 (1980). 胆汁酸, 中外医学社, 東京, 58-59.